

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-066304  
(43)Date of publication of application : 16.03.2001

(51)Int.Cl.

G01N 33/53  
C12M 1/00  
C12M 1/40  
C12N 15/09  
G01N 31/22  
G01N 33/566  
// C12Q 1/68

(21)Application number : 2000-179715  
(22)Date of filing : 15.06.2000

(71)Applicant : NISSHINBO IND INC  
(72)Inventor : SUZUKI OSAMU  
ICHIHARA TATSUO  
SHIOHATA NAMIKO  
MATSUMURA YOSHIYUKI

(30)Priority

Priority number : 11173966 Priority date : 21.06.1999 Priority country : JP

(54) NUCLEIC ACID IMMOBILIZED BASE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To simply manufacture irrespective of a length of a carrier made of a base material and a compound having a carbodiimide group carried by the material by immobilizing a nucleic acid in a dotted manner at a plurality of positions of the carrier through the carbodiimide group.

SOLUTION: A carrier base material for carrying a compound having a carbodiimide group is solvent insoluble and solid or gel at an ambient temperature or its near temperature range. As the carrier base material, for example, plastic, inorganic polymer, ceramics or the like is used. As the compound having the carbodiimide group, a carbodiimide having a low molecular weight such as a monocarbodiimide synthesized by a general manufacturing process such as a dehydration from a polycarbodiimide is used. The polycarbodiimide is manufactured from an organic polyisocyanate compound in the presence of a catalyst for accelerating carbodiimide deriving of an isocyanate. The nucleic acid immobilized base is manufactured by immobilizing the same or different nucleic acids in a dotted manner at a plurality of positions of the carrier made of a solvent insoluble base material and the carbodiimide compound carried on the base material through the carbodiimide group.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C): 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-66304

(P2001-66304A)

(43) 公開日 平成13年3月16日 (2001.3.16)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード* (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	M
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A
1/40		1/40	B
C 1 2 N 15/09	Z N A	G 0 1 N 31/22	1 2 1 P
G 0 1 N 31/22	1 2 1	33/566	

審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-179715 (P2000-179715)

(22) 出願日 平成12年6月15日 (2000.6.15)

(31) 優先権主張番号 特願平11-173966

(32) 優先日 平成11年6月21日 (1999.6.21)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000004374

日清紡績株式会社

東京都中央区日本橋人形町2丁目31番11号

(72) 発明者 鈴木 収

千葉県千葉市緑区大野台1-2-3 日清

紡績株式会社研究開発センター内

(72) 発明者 市原 竜生

千葉県千葉市緑区大野台1-2-3 日清

紡績株式会社研究開発センター内

(74) 代理人 100089244

弁理士 遠山 勉 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸固定化基板

(57) 【要約】

【課題】 簡易な装置で作製可能な、核酸を担体上にその長さに関係なく微小な点状に強固に固定化した核酸固定化基板を提供する。

【解決手段】 基材と基材上に担持されたカルボジイミド基またはイソシアネート基を有する化合物からなる担体の複数箇所に、同一又は異なる核酸が前記カルボジイミド基またはイソシアネート基を介して点状に、好ましくは、直径が10~3000  $\mu$ mである円形状に、固定された核酸固定化基板。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 基材と基材上に担持されたカルボジイミド基を有する化合物からなる担体の複数箇所に、同一又は異なる核酸が前記カルボジイミド基を介して点状に固定された核酸固定化基板。

【請求項2】 前記点がほぼ円形であり直径が10～3000 $\mu\text{m}$ である請求項1記載の核酸固定化基板。

【請求項3】 核酸の鎖長が10～300ヌクレオチドである請求項1記載の核酸固定化基板。

【請求項4】 カルボジイミド基を有する化合物が基材表面に共有結合を介して担持されている請求項1記載の核酸固定化基板。

【請求項5】 核酸が固定化された点の数が基板1 $\text{cm}^2$ あたり10～10000個である請求項1記載の核酸固定化基板。

【請求項6】 基材と基材上に担持されたイソシアネート基を有する化合物からなる担体の複数箇所に、同一又は異なる核酸が前記イソシアネート基を介して点状に固定された核酸固定化基板。

【請求項7】 前記点がほぼ円形であり直径が10～3000 $\mu\text{m}$ である請求項6記載の核酸固定化基板。

【請求項8】 核酸の鎖長が10～300ヌクレオチドである請求項6記載の核酸固定化基板。

【請求項9】 イソシアネート基を有する化合物が基材表面に共有結合を介して担持されている請求項6記載の核酸固定化基板。

【請求項10】 核酸が固定化された点の数が基板1 $\text{cm}^2$ あたり10～10000個である請求項6記載の核酸固定化基板。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は核酸固定化基板に関し、詳しくは、担体上に核酸を微小な点状に強固に固定化した、DNAアレー等として有用な核酸固定化基板に関する。

【0002】

【従来の技術】現在、DNAチップ、DNAアレー等に用いられる、担体上に核酸を微小な点状に固定化した核酸固定化基板を作製するには、次の2つの方法が主に用いられている。

【0003】①ポリーレージンをコートした基材を担体として用いて物理吸着で核酸を固定する方法（WO9535505（特表平10-503841号））。

②基材上でDNAを合成する方法（WO9710365）。

【0004】しかし、上記①の方法については、この方法で作製された核酸固定化基板を用いてハイブリダイゼーションを行った場合、特に操作過程で基板から核酸が剥がれ落ち、結果として検出感度が下がったり、得られる結果にバラツキを生じ再現性の点で問題がある等の欠点があった。さらに、①の方法における核酸の固定化効

率について言えば、長い核酸は特に問題なく固定化できるが、オリゴマーなどの約300mer以下の短い核酸になると効率よく固定できないという欠点があった。

【0005】また、上記②の方法については、基材上でDNAを合成するために特別な機械と試薬が必要であり、誰でも気軽にできるものではなかった。また、合成できる核酸も25mer程度までと限られていた。さらに10merより長い核酸については合成もそう容易なものではなかった。

【0006】この様に、これまでの方法では、10merから300merの核酸を固定化した核酸固定化基板を作製することが非常に困難であるばかりか、それ以外の長さの核酸の固定化についても、強固な固定ができなかったり、簡易な装置での固定ができない等の問題があった。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記観点からなされたものであり、簡易な装置で作製可能な、核酸を担体上にその長さに関係なく微小な点状に強固に固定化した核酸固定化基板を提供することを課題とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、カルボジイミド基を有する化合物が担持された基材からなる担体に核酸をカルボジイミド基を介して固定化させれば、核酸を担体上にその長さに関係なく微小な点状に強固に固定化できること、および、イソシアネート基を有する化合物が担持された基材からなる担体に核酸をイソシアネート基を介して固定化させれば、核酸を担体上にその長さに関係なく微小な点状に強固に固定化できることを見出し、本発明の完成に至った。すなわち、本発明は以下の通りである。

【0009】（1）基材と基材上に担持されたカルボジイミド基を有する化合物からなる担体の複数箇所に、同一又は異なる核酸が前記カルボジイミド基を介して点状に固定された核酸固定化基板（以下、単に「カルボジイミド担体」ということがある）。

【0010】（2）前記点がほぼ円形であり直径が10～3000 $\mu\text{m}$ である（1）の核酸固定化基板。

【0011】（3）核酸の鎖長が10～300ヌクレオチドである（1）の核酸固定化基板。

【0012】（4）カルボジイミド基を有する化合物が基材表面に共有結合を介して担持されている（1）の核酸固定化基板。

【0013】（5）核酸が固定化された点の数が基板1 $\text{cm}^2$ あたり10～10000個である（1）の核酸固定化基板。

【0014】（6）基材と基材上に担持されたイソシアネート基を有する化合物からなる担体の複数箇所に、同一又は異なる核酸が前記イソシアネート基を介して点状

に固定された核酸固定化基板（以下、単に「イソシアネート担体」ということがある）。

【0015】（7）前記点がほぼ円形であり直径が10～3000μmである（6）の核酸固定化基板。

【0016】（8）核酸の鎖長が10～300ヌクレオチドである（6）の核酸固定化基板。

【0017】（9）イソシアネート基を有する化合物が基材表面に共有結合を介して担持されている（6）の核酸固定化基板。

【0018】（10）核酸が固定化された点の数が基板1cm<sup>2</sup>あたり10～10000個である（6）の核酸固定化基板。

【0019】

【発明の実施の形態】以下に本発明を詳細に説明する。

【0020】＜1＞担体

本発明の核酸固定化基板に用いる担体は、核酸を固定化するためのものであり、基材と基材上に担持されたカルボジイミド基またはイソシアネート基を有する化合物

（以下、それぞれ、単に「カルボジイミド化合物」または「イソシアネート化合物」ということがある）からなるものである。

【0021】A. カルボジイミド担体

（1）基材

本発明に用いられる基材は、上記担体の支持体としての役割を果たすものであって、基本的に、溶剤不溶性であり、かつ常温もしくはその付近の温度範囲内（0～100℃）で固体又はゲル状であるものであれば特に制限されない。なお、基材が溶剤不溶性であるとは、基材に後述の様にカルボジイミド化合物が担持され、次いで担体として核酸が固定化され、その後、例えばDNAチップ等として使用される際の各過程で用いられる水性溶剤、有機溶剤等の各種溶剤に実質的に不溶性であることをいう。

【0022】この様な担体基材の材質として、具体的には、プラスチック、無機高分子、金属、天然高分子、セラミック等が挙げられる。

【0023】上記プラスチックとして具体的には、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリプロピレン、ポリアミド、フェノール樹脂、エポキシ樹脂、ポリカルボジイミド樹脂、ポリ塩化ビニル、ポリフッ化ビニリデン、ポリフッ化エチレン、ポリイミドおよびアクリル樹脂等が、無機高分子としては、ガラス、水晶、カーボン、シリカゲル、およびグラファイト等が、金属としては、金、白金、銀、銅、鉄、アルミニウム、磁石およびパラマグネット等の常温固体金属が、天然高分子としては、セルロース、セルロース誘導体、キチン、キトサン、アルギン酸およびアルギン酸塩等が、セラミックとしては、アパタイト、アルミナ、シリカ、炭化ケイ素、窒化ケイ素および炭化ホウ素等が例示できる。

【0024】上記基材の形状としては、例えば、フィル

ム、平板、繊維等を挙げることができ、またその大きさについては、特に制限はない。

【0025】（2）カルボジイミド基を有する化合物  
本発明に用いるカルボジイミド基を有する化合物としては、例えば、特開昭51-61599号公報に開示されている方法や L. M. Alberino らの方法（J. Appl. Polym. Sci., 21, 190 (1990)）あるいは特開平2-292316号公報に開示されている方法などによって製造することができるポリカルボジイミドやウレアからの脱水、チオウレアからの脱硫など一般的に用いられるカルボジイミドの製造法で合成されたモノカルボジイミド、ジカルボジイミド等の低分子量のカルボジイミド等を挙げることができる。

【0026】上記ポリカルボジイミドは、具体的には、有機ポリイソシアネート化合物からイソシアネートのカルボジイミド化を促進する触媒（例えば3-メチル-1-フェニル-2-ホスホレン-1-オキシド）の存在下に製造することができるものである。

【0027】ポリカルボジイミドの製造に用いる上記有機ポリイソシアネート化合物としては、例えば、4, 4'-ジシクロヘキシルメタンジイソシアネート、m-тетрамethylキシリレンジイソシアネート、2, 4-トリレンジイソシアネート、2, 6-トリレンジイソシアネート、2, 4-トリレンジイソシアネートと2, 6-トリレンジイソシアネートの混合物、粗トリレンジイソシアネート、粗メチレンジフェニルジイソシアネート、4, 4', 4"-トリフェニルメチレントリイソシアネート、キシレンジイソシアネート、ヘキサメチレン-1, 6-ジイソシアネート、リンジイソシアネート、水添メチレンジフェニルジイソシアネート、m-フェニルジイソシアネート、ナフチレン-1, 5-ジイソシアネート、4, 4'-ビフェニレンジイソシアネート、4, 4'-ジフェニルメタンジイソシアネート、3, 3'-ジメトキシ-4, 4'-ビフェニルジイソシアネート、3, 3'-ジメチルジフェニルメタン-4, 4'-ジイソシアネート、イソホロンジイソシアネートやこれらの任意の混合物を挙げることができる。

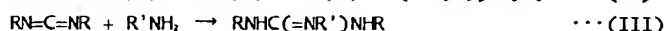
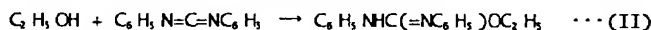
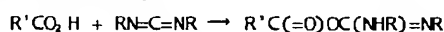
【0028】上記ポリイソシアネート化合物又はそれらの混合物のイソシアネート基をカルボジイミド化することによって重縮合が起こる。その際、適当な段階でモノイソシアネートの1種または2種以上を適当量加え、カルボジイミド化合物の末端を封止することにより、分子量（重合度）を調整することができる。また、モノイソシアネートは、重縮合反応の初めから適当量加えてもよい。このようなモノイソシアネートとしては、フェニルイソシアネート、（オルト、メタ、パラ）-トリルイソシアネート、ジメチルフェニルイソシアネート、n-ブチルイソシアネート、シクロヘキシルイソシアネート、メチルイソシアネート等を例示することができる。重合度は、ポリイソシアネート化合物等の濃度や反応時間に

よっても調整することができる。

【0029】また、この他にも末端封止剤としては、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-SH$ 、 $-NH$ 等の官能基を末端に有するアルキル基を有する化合物約1モルと、芳香族ジイソシアネート2モルとの反応によって簡単に製造できるイソシアネート末端化合物から誘導されるものでもよい。

【0030】上記有機イソシアネートのカルボジイミド化を促進する触媒としては、種々のものを例示することができるが、1-フェニル-2-ホスホレン-1-オキシド、3-メチル-1-フェニル-2-ホスホレン-1-オキシド、1-エチル-2-ホスホレン-1-オキシドやこれらの3-ホスホレン異性体などが収率その他の面で好適である。

【0031】上記ポリカルボジイミドの製造は、無溶媒又は非反応性の有機溶媒中で行うものであり、本発明ではこれらにより製造したポリカルボジイミドの一種又は混合物をカルボジイミド化合物の一例として用いることができる。なお、これらのポリカルボジイミドは、部分的に架橋したものであってもよい。



【0035】したがって、本発明に用いる担体は、このようなカルボジイミド基の反応性を利用して核酸をカルボジイミド化合物を介して強固に固定できるのである。

#### 【0036】(3) 担体

本発明に用いる核酸を固定化するための担体は、上記基材と、該基材上に担持された、上記カルボジイミド化合物よりなる。なお、本明細書でいう「担持」とは、担体に核酸を固定化する際や核酸固定化基板をDNAチップ等として使用する際等に用いられる水性溶剤、有機溶剤等の各種溶剤中で、基材からカルボジイミド化合物が実質的に脱離しないことを意味する。

【0037】本発明に用いられる担体において、上記カルボジイミド化合物は上記基材上に担持される限り、単に物理的な接着性を利用して担持されていてもよく、また、化学的に共有結合等を介して担持されていてもよい。しかし、本発明に用いられる担体において、基材上へのカルボジイミド化合物の担持は共有結合を介して行われることが好ましい。

【0038】また、カルボジイミド化合物は、必要に応じ、基材上の全面において担持されても、また、その一部において担持されてもよい。

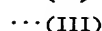
【0039】上記カルボジイミド化合物が基材上に物理的な接着性を利用して担持されている担体を製造する場合に用いるカルボジイミド化合物としては、上記(2)で説明したカルボジイミド化合物のうちの高分子化合物を特に制限なく挙げることができる。また、その分子量の範囲としては、1000以上であり、100000以下

\*【0032】他のカルボジイミド化合物、例えば、特開昭63-172718号公報及び特開昭63-264128号公報に記載されるような、分子構造内にポリオキシエチレン鎖を付加して成る親水性を付与されたタイプのカルボジイミド化合物も本発明に用いることができる。また、モノカルボジイミド化合物、ジカルボジイミド化合物等の低分子量のカルボジイミド化合物も本発明に用いることができるカルボジイミド化合物である。

【0033】上記カルボジイミド化合物におけるカルボジイミド基の反応性は高く、アルコール、アミン、チオール、フェノール、カルボン酸等の有するほとんどの活性水素基と反応するものであり、例えば、カルボン酸との反応は、下記(I)式のように進行し、アルコールとの反応は下記(II)式のように進行し、アミノ基との反応は(III)式のように進行する(Frederick Kurzer, K. Douraghi-Zadeh, Chemical Reviews, 67, 117-135, (1967) および Andrew Williams, Ibrahim T. Ibrahim, Chemical Reviews, 81, 599-606, (1981)参照)。

#### 【0034】

#### \*20 【化1】



下であることが好ましい。

【0040】なお、例えば、上記(2)で説明した有機ポリイソシアネート化合物からイソシアネートのカルボジイミド化を促進する触媒の存在下に製造されたポリカルボジイミドの中には、分子量が1000に満たないものも存在するが、このようなポリカルボジイミドについては、ポリカルボジイミドの両末端に、ウレア結合またはウレタン結合を介して、ポリアルキレン、ポリオキシアルキレン、ポリウレタン、ポリアミドなどを導入し、分子量を前記範囲に調整すればよい。

【0041】上記物理的な接着性を利用して担体に担持されるカルボジイミド高分子化合物は、いずれのタイプであっても、その分子中に2以上100以下のカルボジイミド基を有しているものが好ましく、このカルボジイミド高分子化合物においてカルボジイミド基の数が2未満、すなわち1の場合は核酸を固定する能力に欠け、また逆にカルボジイミド基の数が101以上の場合は性能面では問題はないが、粘度が高すぎたり、溶液とすることができない場合があり、基材上に担持させる際の取り扱い性が悪化することがある。

【0042】このようなカルボジイミド高分子化合物は、上記基材に対して高い接着性を有するものであり、この接着性を利用して基材に担持されるものである。なお、前記カルボジイミド高分子化合物が基材上に物理的な接着性を利用して担持される際の代表的な形態は皮膜である。

【0043】前記基材上に前記カルボジイミド高分子化

合物を被覆で担持させる方法としては、スプレー、浸漬、ブラッシング、スタンプ、蒸着、フィルムコーターを用いたコーティング等の公知の手段を採用することができる。

【0044】次にカルボジイミド化合物を共有結合により担持した担体について説明する。なお、本明細書において、共有結合を介して基材上、すなわち、基材表面に担持されたカルボジイミド基を有する化合物という場合の「カルボジイミド基を有する化合物」は、該化合物と基材表面間に存在する共有結合部分からは独立した化合物（実際には「基」であるが便宜上「化合物」の用語を用いる）として定義されるものである。したがって、本明細書において、基材上にカルボジイミド基を有する化合物が共有結合を介して担持されている担体に関しては、カルボジイミド基を有する化合物とは、基材表面との共有結合に関与する官能基を含まない化合物として説明される。

【0045】共有結合を介して担持されるカルボジイミド化合物は、上記（2）に説明したいずれのタイプであってもよい。また、上記担体が基材表面に共有結合を介して有するカルボジイミド化合物は、その分子中に5～30個のカルボジイミド基を有しているものが好ましく、前記カルボジイミド基の個数はより好ましくは7～20個である。前記カルボジイミド化合物におけるカルボジイミド基の数が5個以上、且つ30個以下であると、核酸を固定するために良好な能力が得られ、また、溶液が適度な粘度となり取り扱いの点でも好ましい。

【0046】上記基材の表面に共有結合を介して上記カルボジイミド基を有する化合物を担持させた担体（以下、「カルボジイミド化合物共有結合型担体」ということもある）を得るには、例えば、担体とした際に核酸を固定化するためのカルボジイミド基とそれ以外に基材表面に共有結合するための官能基を有するカルボジイミド化合物を、表面に上記カルボジイミド化合物が有する官能基と共有結合可能な官能基を有する基材の官能基に、適当な方法によって共有結合させればよい。

【0047】より具体的には、カルボジイミド化合物共有結合型担体は、2個以上のカルボジイミド基を有するまたは1個以上のカルボジイミド基と1個以上のカルボジイミド基以外の官能基を有する化合物を、表面にカルボジイミド基または前記カルボジイミド基以外の官能基と共有結合可能な官能基を有する基材の官能基に、前記化合物の有するカルボジイミド基の少なくとも1個を残して共有結合させることにより得られる。

【0048】上記カルボジイミド化合物共有結合型担体を製造する際に用いる、2個以上のカルボジイミド基を有するまたは1個以上のカルボジイミド基と1個以上のカルボジイミド基以外の官能基を有する化合物として、具体的には、上記（2）で挙げたカルボジイミド化合物のうちの2個以上のカルボジイミド基を有する化合物お

よび1個以上のカルボジイミド基と1個以上のカルボジイミド基以外の官能基を有する化合物等が挙げられる。さらに、上記（2）で挙げたカルボジイミド化合物に、共有結合に供するための官能基、例えば、水酸基、イミノ基、アミノ基、カルボキシル基、イソシアネート基、イソチオシアネート基等の官能基から選ばれる官能基を適当な方法により導入した化合物を、上記カルボジイミド化合物共有結合型担体の製造に用いることも可能である。また、上記（2）で挙げたカルボジイミド化合物に共有結合に供するための官能基としてさらにカルボジイミド基を導入した化合物を、上記担体の製造に用いてもよい。カルボジイミド化合物にこのような官能基を導入する方法については、従来公知の方法をとることができる。

【0049】また、上記カルボジイミド化合物共有結合型担体を製造する際に用いる、表面にカルボジイミド基または上記化合物の有するカルボジイミド基以外の官能基と共有結合可能な官能基を有する基材としては、例えば、上記（1）で説明した基材表面に前記共有結合可能な官能基を導入した基材が挙げられる。導入される官能基としては、カルボジイミド基と共有結合可能な官能基または上記化合物が有するカルボジイミド基以外の官能基と共有結合可能な官能基であれば特に制限されないが、具体的には、水酸基、イミノ基、アミノ基、カルボキシル基、カルボジイミド基等が挙げられる。これら官能基は、上記カルボジイミド化合物の有する共有結合に供する官能基に応じて適宜選択され、基材表面に導入される。

【0050】また、基材表面にこのような官能基を導入する方法については、基材の材質や導入する官能基によって適当な方法が適宜選択される。さらに、官能基を導入するのは、基材表面の全体であってもよいし、一部であってもよい。

【0051】例えば、ガラス基材の表面全体にアミノ基を導入するには、3-アミノプロピルトリエトキシシラン等のアミノ置換オルガノアルコキシシランを適当な溶媒に溶解して得られた溶液に70～80℃程度の温度条件下でガラス基材を概ね2～3時間浸漬した後、これを取り出して溶液を水洗しさらに、100～120℃程度で約4～5時間加熱乾燥すればよい。

【0052】また、ガラス基材にアミノ基以外の官能基を導入する場合や、基材がガラス以外の材料からなる場合においても、上記基材の説明で挙げた各種材料表面に種々の官能基を導入することは、従来より一般に行われていることであり、その方法も公知であるので、このような公知の方法を用いて基材表面への官能基の導入を行うことができる。

【0053】さらに、上記（1）で挙げた基材のうちでもプラスチック基材のなかには、基材表面に既に上記のような官能基を有するものもあり、この場合には基材表

10

20

30

40

50

面に官能基を導入することなしに、これをそのまま上記カルボジイミド化合物共有結合型担体の製造に用いることが可能である。また、この様なプラスチック基材であってもさらに官能基を導入して上記担体の製造に用いることも可能である。

【0054】本発明に用いるカルボジイミド化合物共有結合型担体を製造するには、上記の様に得られる2個以上のカルボジイミド基を有するまたは1個以上のカルボジイミド基と1個以上のカルボジイミド基以外の官能基を有する化合物と、表面にカルボジイミド基または前記カルボジイミド基以外の官能基と共有結合可能な官能基を有する基材を適当な条件下で反応させ、前記基材表面の官能基に前記化合物を、前記化合物の有するカルボジイミド基の少なくとも1個を残して共有結合させる。つまり、前記化合物が1個以上のカルボジイミド基と1個以上のカルボジイミド基以外の官能基を有する化合物である場合には、カルボジイミド基以外の官能基が共有結合に供する様な反応条件で反応を行えばよい。また、官能基としてカルボジイミド基のみを有する化合物を用いる場合には、カルボジイミド基の全てが共有結合に供されることのないような条件で反応を行えばよい。

【0055】このようにして得られる、基材と基材上に担持されたカルボジイミド化合物からなる、核酸固定化のための担体は、前記カルボジイミド化合物の有するカルボジイミド基の反応性を利用して、様々な種類や大きさの核酸を強固に固定することができるものである。

【0056】B. イソシアネート担体

#### (1) 基材

本発明の核酸を固定化する担体に用いられる基材は、前記担体の支持体としての役割を果たすものであって、溶剤不溶性である。詳細には、本発明に用いる基材は、後述の様に表面にイソシアネート基が導入され、ついで、担体として核酸を固定化し、さらに、核酸を固定した状態で生理化学的な生産、分析等に供されるが、これらの各過程で用いられる水性溶剤、有機溶剤等の各種溶剤に実質的に不溶性である。本発明に用いる基材は、上記の様に溶剤不溶性であって、基本的には、常温もしくはその付近の温度範囲内(0~100℃)で固体又はゲル状であるものであれば特に制限されない。この様な担体基材の材質として、具体的には、プラスチック、無機高分子、金属、天然高分子、セラミック等が挙げられる。

【0057】プラスチックとして具体的には、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリプロピレン、ポリアミド、フェノール樹脂、エポキシ樹脂、ポリカルボジイミド樹脂、ポリ塩化ビニル、ポリフッ化ビニリデン、ポリフッ化エチレン、ポリイミドおよびアクリル樹脂などが、無機高分子としては、ガラス、水晶、カーボン、シリカゲル、およびグラファイト等が、金属としては、金、白金、銀、銅、鉄、アルミニウム、磁石およびパラマグネット等の常温固体金属が、天然高分子と

しては、セルロース、セルロース誘導体、キチン、キトサン、アルギン酸およびアルギン酸塩等が、セラミックとしては、アパタイト、アルミナ、シリカ、炭化ケイ素、窒化ケイ素および炭化ホウ素などを例示することができる。

【0058】上記基材の形状としては、例えば、フィルム、平板、粒子、成型品(ビーズ、ストリップ、マルチウェルプレートのウェル、チューブ、メッシュ、連続発泡フォーム、膜、紙、針、ファイバー、プレート、スライドおよび細胞培養容器)、ラテックスを挙げることができ、またその大きさについては、当然であるが特に制限はない。

#### 【0059】(2) 担体の製造

本発明の核酸を固定化するための担体は、上記溶剤不溶性の基材の表面にイソシアネート基を有するものである。この様な本発明の担体を得るには、例えば、担体とした際に核酸を固定化するためのイソシアネート基を上記基材表面に適当な手段によって直接導入する方法や、イソシアネート基を有する皮膜性の化合物を被覆等の手段によって上記基材表面に担持させる方法、イソシアネート基を有する化合物を上記基材表面に共有結合を介して担持させる方法等が挙げられる。

【0060】例えば、上記方法の内でも、イソシアネート基を有する皮膜性の化合物を被覆等によって基材表面に担持させる方法として、具体的には、イソシアネート基を有する皮膜性の化合物を必要に応じて適当な溶媒に溶解し、得られた溶液をスプレー、浸漬、ブラッシング、スタンプ、蒸着、フィルムコート等の方法によって基材表面の一部または全体に塗布し、さらに必要に応じて乾燥させることで、被覆を施す等の手段が挙げられる。また、この様にして基材表面に被覆が可能なイソシアネート基を有する化合物として、具体的には、末端にイソシアネート基を有するポリカルボジイミド類や、例えば、イソシアネートプロピルトリエトキシシラン等のイソシアネート基を有するトリアルコキシシラン等が挙げられる。

【0061】また、基材表面に共有結合によりイソシアネート基を有する化合物を担持させる方法として、具体的には、イソシアネート基とそれ以外に基材表面に共有結合するための官能基を有する化合物を、表面に前記化合物が有する官能基と共有結合可能な官能基を有する基材の官能基に、適当な方法によって共有結合させる方法等が挙げられる。この様にして得られる本発明の、共有結合によりイソシアネート基を有する化合物が溶剤不溶性の基材表面に担持されてなる担体は、イソシアネート基を有する化合物が共有結合を介して強固に基材表面に担持されているものであり、耐久性等に優れる担体である。

【0062】さらに、上記共有結合によりイソシアネート基を有する化合物を基材表面に担持させる方法とし

て、より具体的には、以下に説明する製造方法を挙げることができる。

【0063】この製造方法は、表面にイソシアネート基を有する溶剤不溶性の基材からなる核酸を固定するための担体を製造する方法であって、2個以上のイソシアネート基を有するまたは1個以上のイソシアネート基と1個以上のイソシアネート基以外の官能基もしくはハロゲン原子を有する化合物（以下、単に「イソシアネート化合物」ということがある）を、表面にイソシアネート基と共有結合可能なまたは前記イソシアネート基以外の官能基もしくはハロゲン原子と共有結合可能な官能基を有する溶剤不溶性の基材の官能基に、前記化合物の有するイソシアネート基の少なくとも1個を残して共有結合させる工程を含むことを特徴とするものである。

【0064】上記の製造方法に用いるイソシアネート化合物のうち、分子内に2個以上のイソシアネート基を有する化合物として、具体的には、ヘキサメチレンジイソシアネート、トルエンレンジイソシアネート、テトラメチルキシレンジイソシアネート、ナフタレンジイソシアネート等が挙げられる。

【0065】また、分子内に1個以上のイソシアネート基と1個以上のイソシアネート基以外の官能基あるいはハロゲン原子を有する化合物のイソシアネート基以外の官能基として、具体的には、水酸基、アミノ基、イミノ基、カルボキシル基等の官能基が挙げられ、このようなイソシアネート化合物として、具体的には、イソシアン酸クロロメチルエステル、イソシアン酸クロロエチルエステル等が挙げられる。

【0066】上記の製造方法に用いる、表面にイソシアネート基と共有結合可能なまたは上記化合物の有するイソシアネート基以外の官能基もしくはハロゲン原子と共有結合可能な官能基を有する溶剤不溶性の基材としては、例えば、上記<1>B(1)で説明した基材表面に前記共有結合可能な官能基を導入した溶剤不溶性の基材が挙げられる。導入される官能基としては、イソシアネート基と共有結合可能な官能基または上記化合物が有するイソシアネート基以外の官能基もしくはハロゲン原子と共有結合可能な官能基であれば特に制限されないが、具体的には、水酸基、イミノ基、アミノ基、カルボキシル基等が挙げられる。これら官能基は、上記イソシアネート化合物の有する官能基に応じて適宜選択され、基材表面に導入される。

【0067】また、溶剤不溶性基材表面にこのような官能基を導入する方法については、基材の材質や導入する官能基によって適当な方法が適宜選択される。さらに、官能基を導入するのは、基材表面の全体であってもよいし、一部であってもよい。

【0068】例えば、ガラス基材の表面全体にアミノ基

を導入するには、3-アミノプロピトリエトキシシラン等のアミノ置換オルガノアルコキシシランを適当な溶媒に溶解して得られた溶液に70～80℃程度の温度条件下でガラス基材を概ね2～3時間浸漬した後、これを取り出して溶液を水洗しさらに、100～120℃程度で約4～5時間加熱乾燥すればよい。

【0069】また、ガラス基材にアミノ基以外の官能基を導入する場合や、基材がガラス以外の材料からなる場合においても、上記基材の説明で挙げた各種材料表面に種々の官能基を導入することは、従来より一般に行われていることであり、その方法も公知であるので、この様な公知の方法を用いて基材表面への官能基の導入を行うことができる。

【0070】さらに、上記<1>B(1)で挙げた基材のうちでもプラスチック基材のなかには、基材表面に既に上記のような官能基を有するものもあり、この場合には基材表面に官能基を導入することなしに、これをそのまま本発明の製造方法に用いることが可能である。また、このようなプラスチック基材であってもさらに官能基を導入して本発明に用いることも可能である。

【0071】上記の製造方法においては、上記の様にし得られる2個以上のイソシアネート基を有するまたは1個以上のイソシアネート基と1個以上のイソシアネート基以外の官能基もしくはハロゲン原子を有する化合物と、表面にイソシアネート基と共有結合可能なまたは前記イソシアネート基以外の官能基もしくはハロゲン原子と共有結合可能な官能基を有する溶剤不溶性の基材を適当な条件下で反応させ、前記基材表面の官能基に前記化合物を前記化合物の有するイソシアネート基の少なくとも1個を残して共有結合させる。つまり、前記化合物が1個以上のイソシアネート基と1個以上のイソシアネート基以外の官能基もしくはハロゲン原子を有する化合物である場合には、イソシアネート基以外の官能基もしくはハロゲン原子が共有結合に供する様な反応条件で反応を行えばよい。また、官能基としてイソシアネート基のみを有する化合物を用いる場合には、イソシアネート基の全てが共有結合に供されることのないような条件で反応を行えばよい。

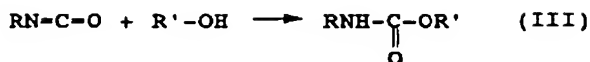
【0072】このようにして得られる本発明の表面にイソシアネート基を有する溶剤不溶性の基材からなる核酸を固定化するための担体は、イソシアネート基の反応性を利用して、様々な核酸を固定することができるものである。また、イソシアネート基の反応性を示す例としては、下記(III)に示す水酸基との反応、下記(IV)に示すアミノ基との反応等が挙げられる。

【0073】

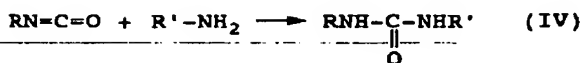
【化2】



13



14



#### 【0074】<2>核酸固定化基板

本発明の核酸固定化基板は、上記基材と基材上に担持されたカルボジイミド化合物またはイソシアネート化合物からなる担体の複数箇所に、同一又は異なる核酸が前記カルボジイミド基またはイソシアネート基を介して点状に固定されたものである。

【0075】本発明の核酸固定化基板において、担体に核酸が点状に固定されるとは、担体の大きさに対して、核酸固定化部位が複数箇所設けられる程度に十分小さいことをいう。前記点の形状は、特に制限されず、核酸固定化基板の使用形態、用途等により適宜選択されうる。

【0076】本発明の核酸固定化基板の点状の核酸固定部位について、具体的には、上記点の形状がほぼ円形であり、直径が10～3000μmであるものが挙げられる。また、前記点のより好ましいサイズとして、直径50～2000μm程度が挙げられ、さらに好ましいサイズとして、直径100～1500μm程度が挙げられる。なお、形状がほぼ円形であるとは、その形状が真円形に限らず楕円形等の円形に近い形状を特に制限なく含むことをいい、例えば、楕円形においてその直径とは長径と短径の平均値をいう。

【0077】前記点のサイズについては、直径が10μm未満では検出が困難となる場合があり、直径が3000μmを越えると単位面積あたりに適度な数の点を確保することが困難となる場合がある。したがって、検出の容易性や、所望の数の点を単位面積あたりに設けることを考慮すれば、点のサイズを上記範囲とすることが好ましい。

【0078】また、本発明の核酸固定化基板における点状に固定化された核酸固定部位の数については特に制限されず、核酸固定化基板の使用形態、用途等により適宜選択されうるが、具体的には、前記核酸固定部位の数が基板1cm<sup>2</sup>あたり10～10000個程度、好ましくは、50～350個程度である核酸固定化基板が挙げられる。さらに、本発明の核酸固定化基板における点状の核酸固定部位の配置についても、核酸固定化基板の使用形態、用途等により適宜選択されうるものである。

【0079】本発明の核酸固定化基板に固定化される核酸としては、天然または合成のDNA（オリゴヌクレオチドを含む）もしくはRNA（オリゴヌクレオチドを含む）が特に制限なく挙げられる。本発明においては、特にこれまで固定化が困難であった鎖長が10～300ヌクレオチドである核酸についても、固定することが可能である。また、固定化される核酸は1本鎖であっても、

2本鎖であっても構わない。さらに、本発明においては、前記核酸として、通常、カルボジイミド基またはイソシアネート基との反応性を有する官能基を有する核酸が用いられる。上記本発明の核酸固定化基板において点状に固定化されている核酸は同一であっても異なってもよく、異なる核酸を用いる場合の各核酸の配置等については、得られる核酸固定化基板の使用形態、用途等により適宜選択されうる。

【0080】このような核酸を上記担体に点状に固定するには、担体上のカルボジイミド化合物またはイソシアネート化合物が担持された部位に、適当な条件下で、微量の核酸を所望の大きさの点状に供給することで、カルボジイミド化合物またはイソシアネート化合物と核酸を接触させ両者を反応させれば良い。担体に担持されたカルボジイミド化合物のカルボジイミド基またはイソシアネート化合物のイソシアネート基と、核酸が有する水酸基、アミノ基、チオール基、カルボキシル基等との反応により、核酸はカルボジイミド化合物またはイソシアネート化合物と共有結合する。その結果、核酸は担体に固定化される。

【0081】具体的には、両者の接触反応において固定される核酸の活性が維持されるように、通常、核酸は水またはバッファー中に含まれるかたちで供給される。また、接触の際の温度としてはやはり固定される核酸の活性が損なわれないように、概ね0～100℃とすることが好ましい。

【0082】本発明において微量の核酸を、通常は、核酸を含有する水またはバッファーを、担体に点状に供給する手段として、ディスペンサーを用いる方法、ピンを用いる方法、バブルジェット（登録商標）を用いる方法等があるが、本発明がこれらに限定されるものではない。また、この様に溶液を微量に供給する装置は、一般に市販されており、本発明においてもこれらを用いることが可能である。

【0083】本発明の核酸固定化基板は、これを用いて分析等を行う際に、上記固定化核酸以外の核酸等を接触させる機会が多いが、担体に担持されたカルボジイミド化合物の有する未反応カルボジイミド基またはイソシアネート化合物の有する未反応イソシアネート基に上記固定化核酸以外の核酸等が非特異的に結合することを防ぐために、上記の様に点状に核酸を担体に固定化した後に、過剰量のウシ血清アルブミン（BSA）、カゼイン、サケ精子DNAのようなブロッキング用途のハイブリダイゼーション反応で一般的に用いられる核酸等を担

体に接触させ、フリーのカルボジイミド基またはイソシアネート基をブロックしておくことが好ましい。

【0084】この様にして得られる本発明の核酸固定化基板は、前記核酸が担体に非常に強固に担持されたものであり、ハイブリダイゼーション等で広く使用されている洗浄法（界面活性剤を用いた洗浄法）によっても脱離することがなく、これを用いて分析等を行った場合、再現性、定量性に優れた分析が可能となる。また、本発明の核酸固定化基板には、核酸が、鎖の数や長さに制限されずに固定され得るので、同一基材上で種々の核酸を同時に扱うことができる。これらのことから、本発明の核酸固定化基板は、多数の核酸を用いてハイブリダイゼーション法により塩基配列を決定する技術、SBH (sequencing by hybridization) 法、SHOM (sequencing by hybridization with oligonucleotide matrix) 法等に用いられるDNAアレー等に優れた性能をもって適用可能であるといえる。

【0085】

【実施例】以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。％は特記しない限り質量％である。

【0086】

【製造例1】カルボジイミド化スライドガラスの調製

(1) カルボジイミド化合物溶液の製造

4, 4'-ジシクロヘキシルメタンジイソシアネート 11.7 g とシクロヘキシルイソシアネート 12.5 g をカルボジイミド化触媒 (3-メチル-1-フェニル-2-ホスホレン-1-オキソド) 1.3 g と共に窒素雰囲気下、180℃で4日間反応させ、室温で粉末状のカルボジイミド化合物 (重合度10、数平均分子量2400) を得た。これを10g取り、ジクロロメタン200

ml に溶解させ、カルボジイミド化合物溶液を得た。

【0087】(2) アミノ化スライドガラスの作製

蒸留水180mlに10% (v/v) 3-アミノプロピルトリエトキシシラン/エタノール溶液20mlを加えよく攪拌した。そこに6NのHClを加え、pH3~4に調整した後、スライドガラス15枚を浸漬し、75℃で2時間加熱処理した。加熱処理終了後、スライドガラスを溶液から引き上げ、蒸留水でよく洗い流した後、115℃で4時間加熱乾燥して、アミノ化スライドガラスを得た。

【0088】(3) カルボジイミド化スライドガラスの作製

上記(1)で得られたカルボジイミド化合物溶液200mlに、上記(2)で得られたアミノ化スライドガラス15枚を浸漬し、すぐに引き上げて、60℃で1時間加熱乾燥した。次に、これらのスライドガラスをジクロロメタン200mlを用いて10分間づつ2回洗浄した後、40℃で2時間乾燥してカルボジイミド化スライドガラスを得た。

【0089】

【製造例2】イソシアネート化スライドガラスの調製

(1) アミノ化スライドガラスの作製

蒸留水180mlに10% (v/v) 3-アミノプロピルトリエトキシシラン/エタノール溶液20mlを加えよく攪拌した。そこに6NのHClを加えpH3~4に調整した後、スライドガラス15枚を浸漬し、75℃で2時間加熱処理した。加熱処理終了後、スライドガラスを溶液から引き上げ、蒸留水でよく洗い流した後、115℃で4時間加熱乾燥しアミノ化スライドガラスを得た。

【0090】(2) イソシアネート化スライドガラスの作製

ヘキサメチレンジイソシアネートの2.5%クロロホルム溶液に上記で得られたアミノ化スライドガラス15枚を浸漬し、すぐに引き上げた。次いで、クロロホルム200mlによる10分間の洗浄を2回行った後、40℃で2時間乾燥してイソシアネート化スライドガラスを得た。

【0091】

20 【実施例1】(1) カルボジイミド化スライドガラス上への核酸の固定

大腸菌O-157の染色体DNAを鋳型として、配列番号1及び2に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとするPCR (ポリメラーゼ・チェーン・リアクション) によって、配列番号3に示す塩基配列を有するVT2遺伝子 (ベロ毒素遺伝子) 断片を増幅した。

【0092】上記増幅産物を0.1pmol/μlになるように2M NaClに溶解し、DNA溶液とした。

30 SPBIO (日立ソフトウェアエンジニアリング社製、arrayer) を用い、上記製造例1で得られたカルボジイミド化スライドガラスの所定の位置に、前記DNA溶液を直径200μmで500箇所スポットした。DNAをスポットしたカルボジイミド化スライドガラスを乾燥機に入れ、37℃で15分間乾燥した。次いで、3%BSA (ウシ血清アルブミン) を含む緩衝液A (0.2M塩化ナトリウム、0.1Mトリス塩酸 (pH7.5)、0.05%トライトンX-100) に浸し、37℃で15分間乾燥した。次にスライドガラスをTE

40 緩衝液 (10mMトリス塩酸、pH7.2/1mMEDTA) で洗浄した後、37℃で15分間乾燥し、核酸 (二本鎖DNA) を固定化したカルボジイミド化スライドガラスを得た。

【0093】(2) ハイブリダイゼーション

DNAを固定化したカルボジイミド化スライドガラスを100℃熱水中に10分間浸漬し、氷冷水中に5分間浸漬し、二本鎖DNAを変性させた。このスライドガラスのDNAを固定化した部分に、ハイブリダイゼーション溶液30μlを載せ、スライドガラスをパラフィルムで覆って、42℃のウォーターバスで一晩加熱した。ハイ

ブリダイゼーション溶液の組成は以下の通りである。  
尚、ビオチン化プローブは、前記オリゴヌクレオチドプライマーを用いて、VT2遺伝子を増幅することによって作製した。これを熱変性させてプローブとした。

〔0094〕〔ハイブリダイゼーション溶液の組成〕  
5× SSC (SSC: 1.5M NaCl, 0.15Mクエン酸ナトリウム)  
1× デンハーツ溶液 (Denhardt's solution)  
25mM リン酸ナトリウムバッファー (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 含有) pH 6.5  
45% ホルムアミド  
10ng/ml サケ (Salmon) 精子DNA  
2pmol ビオチン化プローブ

〔0095〕(3) ポストハイブリダイゼーション洗浄  
ハイブリダイゼーションの後、スライドガラスからパラフィルムを取り除き、ハイブリダイゼーション溶液を軽く吸い取った後、以下の条件でポストハイブリダイゼーション洗浄を行い、非特異的に吸着したプローブを除去した。

〔0096〕〔ポストハイブリダイゼーション洗浄液及び条件〕

第1段階: 2× SSC, 1% SDS; 室温、5分間、2回

第2段階: 0.2× SSC, 1% SDS; 40℃、5分間、2回

第3段階: 2× SSC; 室温、5分間、1回

〔0097〕(4) ハイブリダイゼーションの検出  
3% BSAを含む緩衝液A 50mlに、上記ポストハイブリダイゼーション洗浄後のスライドガラスを浸漬し、室温で30分間ブロッキングを行なった。次に、これらをストレプトアビジン-アルカリフォスファターゼ・コンジュゲート溶液 (Gibco BRL社製、3% BSAを含む緩衝液Aで原液を1000倍希釈したもの) 20mlに浸漬し、室温で30分間反応させた。次いで、スライドガラスを緩衝液A 50mlに浸漬し、室温で5分間放置した。これを2回繰り返し、ビオチンと結合しなかったコンジュゲートを除去した。

〔0098〕次に、スライドガラスを緩衝液B (0.1M塩化ナトリウム/0.1Mトリス塩酸、pH 9.5/50mM塩化マグネシウム) 30mlで1回洗浄した。最後に、スライドガラスを基質溶液 (緩衝液Bの30ml + BCIP溶液 (50mg 5-ブプロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェート/900mlジメチルホルムアミド) 25μl + NBT液 (50mg ニトロブルーテトラゾリウム/1.8ml 70%エタノール) 50μl) に浸漬し、室温で3時間放置し、発色反応を行った結果、スライドガラス上のDNAを固定した位置に色素沈着 (ハイブリダイゼーションシグナル) が得られた。

〔0099〕

〔実施例2〕(1) カルボジイミド化スライドガラス上への核酸の固定

λ DNA (約48kb) を100ng/μlになるように0.1M MgCl<sub>2</sub>に溶解し、DNA溶液とした。  
SPBIO (日立ソフトウェアエンジニアリング社製、arrayer) を用い、上記製造例1で得られたカルボジイミド化スライドガラスの所定の位置に、前記DNA溶液を直径200μmで500箇所スポットした。  
DNAをスポットしたカルボジイミド化スライドガラスを乾燥機に入れ、37℃で15分間乾燥した。次いで、3% BSAを含む緩衝液Aに浸漬し、37℃で15分間乾燥した。次にスライドガラスをTE緩衝液で洗浄した後、37℃で15分間乾燥し、核酸 (DNA) を固定化したカルボジイミド化スライドガラスを得た。

〔0100〕(2) ハイブリダイゼーション  
DNAを固定化したカルボジイミド化スライドガラスを100℃の熱水中に10分間浸漬し、氷冷水中に5分間浸漬し、二本鎖DNAを変性させた。このスライドガラスのDNAを固定化した部分に、ハイブリダイゼーション溶液50μlを載せ、スライドガラスをパラフィルムで覆って、42℃のウォーターバスで一晩加熱した。ハイブリダイゼーション溶液の組成は以下の通りである。  
尚、ビオチン化プローブは、EcoRIで消化したλ DNAを、カルボビオチン (日清紡績 (株) 製) を用いてビオチン化することによって作製した。

〔0101〕〔ハイブリダイゼーション溶液の組成〕  
5× SSC (SSC: 1.5M NaCl, 0.15Mクエン酸ナトリウム)  
1× デンハーツ溶液 (Denhardt's solution)  
10% デキストラン  
45% ホルムアミド  
10ng/ml サケ精子DNA  
1pmol ビオチン化プローブ

〔0102〕(3) ポストハイブリダイゼーション洗浄  
ハイブリダイゼーションの後、スライドガラスからパラフィルムを取り除き、ハイブリダイゼーション溶液を軽く吸い取った後、以下の条件でポストハイブリダイゼーション洗浄を行い、非特異的に吸着したプローブを除去した。

〔0103〕〔ポストハイブリダイゼーション洗浄条件〕

第1段階: 2× SSC, 1% SDS; 室温、5分間、2回

第2段階: 0.2× SSC, 1% SDS; 48℃、5分間、2回

第3段階: 2× SSC; 室温、5分間、1回

〔0104〕(4) ハイブリダイゼーションの検出  
3% BSAを含む緩衝液A 50mlに、上記ポストハイブリダイゼーション洗浄後のスライドガラスを浸漬し、室温で30分間ブロッキングを行なった。次に、これらをストレプトアビジン-アルカリフォスファターゼコンジュゲート溶液 (3% BSAを含む緩衝液Aで原液を2000倍希釈したもの) 45mlに浸漬し、室温で30分間反応させた。次いで、スライドガラスを緩衝液A 50mlに浸漬し、室温で5分間放置した。これを2回繰り返す。

返し、ビオチンと結合しなかったコンジュゲートを除去した。

【0105】次に、スライドガラスを緩衝液B 30mlで1回洗浄した。最後に、基質溶液（緩衝液B 20ml + BCIP溶液 18  $\mu$ l + NBT液 50  $\mu$ l）に浸漬し、室温で3時間放置し、発色反応を行った結果、スライドガラス上のDNAを固定した位置に色素沈着が得られた。

【0106】

【実施例3】（1）カルボジイミド化スライドガラス上への核酸固定

配列番号2に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド（21mer）を、100ng/ $\mu$ lになるように2M NaClに溶解し、DNA溶液とした。SPBIO（日立ソフトウェアエンジニアリング社製、arrayer）を用い、上記製造例1で得られたカルボジイミド化スライドガラスの所定の位置に、前記DNA溶液を直径200  $\mu$ mで500箇所スポットした。対照として、プローブに対して相補性を有しないDNA（tet）の溶液（100ng/ $\mu$ l）を、カルボジイミド化スライドガラスの所定の位置に100箇所スポットした。DNAをスポットしたカルボジイミド化スライドガラスを乾燥機に入れ、37℃で15分間乾燥した。次いで、3%BSAを含む緩衝液Aに浸し、37℃で15分間乾燥した。次に、スライドガラスをTE緩衝液で洗浄した後、37℃で15分間乾燥し、核酸（一本鎖DNA）を固定化したカルボジイミド化スライドガラスを得た。

【0107】（2）ハイブリダイゼーション

DNAを固定化したカルボジイミド化スライドガラスのDNAを固定化した部分に、ハイブリダイゼーション溶液50  $\mu$ lを載せ、スライドガラスをパラフィルムで覆って、42℃のウォーターバスで一晩加熱した。ハイブリダイゼーション溶液の組成は以下の通りである。尚、ビオチン化プローブは、実施例1で用いたビオチン化プローブと同じものを使用した。

【0108】〔ハイブリダイゼーション溶液の組成〕

3 $\times$  SSC

10% デキストラン

1pmol ビオチン化プローブ

【0109】（3）ポストハイブリダイゼーション洗浄  
ハイブリダイゼーションの後、スライドガラスからパラフィルムを取り除き、ハイブリダイゼーション溶液を軽く吸い取った後、以下の条件でポストハイブリダイゼーション洗浄を行ない、非特異的に吸着したプローブを除去した。

【0110】〔ポストハイブリダイゼーション洗浄条件〕

第1段階：2 $\times$  SSC、0.1% SDS；室温、5分間、2回

第2段階：0.2 $\times$  SSC、0.1% SDS；40℃、5分間、2回

第3段階：2 $\times$  SSC；室温、5分間、1回

【0111】（4）ハイブリダイゼーションの検出

3%BSAを含む緩衝液A 50mlに浸し、室温で30分間ブロッキングを行った。次に、ストレプトアビジンアルカリフォスファターゼコンジュゲート溶液（3%BSAを含む緩衝液Aで原液を2000倍希釈したもの）45mlに浸し、室温で30分間反応させた。次に、スライドガラスを緩衝液A 50mlに浸し、室温で5分間放置した。これを2回繰り返し、ビオチンと結合しなかったコンジュゲートを除去した。次にスライドガラスを緩衝液B 30mlで1回洗浄した。最後に基質溶液（緩衝液B 20ml + BCIP溶液 18  $\mu$ l + NBT液 36  $\mu$ l）に浸し、室温で3時間放置し、発色反応を行った結果、スライドガラス上の配列番号2に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを固定化した位置にのみ色素沈着が得られ、tetを固定化した位置には色素沈着は検出されなかった。

【0112】

【実施例4】（1）カルボジイミド化スライドガラス上への核酸固定

配列番号2に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド（21mer）を、100ng/ $\mu$ lになるように2M NaClに溶解し、DNA溶液とした。SPBIO（日立ソフトウェアエンジニアリング社製、arrayer）を用い、上記製造例1で得られたカルボジイミド化スライドガラスの所定の位置に、前記DNA溶液を直径200  $\mu$ mで500箇所スポットした。対照として、プローブに対して相補性を有しないDNA（tet）を100箇所スポットした。DNAをスポットしたカルボジイミド化スライドガラスを乾燥機に入れ、37℃で15分間乾燥した。次いで、3%BSAを含む緩衝液Aに浸し、37℃で15分間乾燥した。TE緩衝液で洗浄した後、37℃で15分間乾燥し、核酸（一本鎖DNA）を固定化したカルボジイミド化スライドガラスを得た。

【0113】（2）ハイブリダイゼーション

DNAを固定化したカルボジイミド化スライドガラスのDNAを固定化した部分に、ハイブリダイゼーション溶液50  $\mu$ lを載せ、スライドガラスをパラフィルムで覆って、42℃のウォーターバスで一晩加熱した。ハイブリダイゼーション溶液の組成は以下の通りである。尚、ビオチン化プローブは、実施例1で用いたビオチン化プローブと同じものを使用した。

【0114】〔ハイブリダイゼーション溶液の組成〕

3 $\times$  SSC

10% デキストラン

1pmol ビオチン化プローブ

【0115】（3）ポストハイブリダイゼーション洗浄  
ハイブリダイゼーションの後、スライドガラスからパラフィルムを取り除き、ハイブリダイゼーション溶液を軽く吸い取った後、以下の条件でポストハイブリダイゼー

ション洗浄を行ない、非特異的に吸着したブローブを除去した。

【0116】〔ポストハイブリダイゼーション洗浄条件〕

第1段階：2×SSC、0.1% SDS；室温、5分間、2回

第2段階：0.2×SSC、0.1% SDS；40℃、5分間、2回

第3段階：2×SSC；室温、5分間、1回

【0117】(4) ハイブリダイゼーションの検出

3% BSAを含む緩衝液A 50 mlに浸し、室温で30分間ブロッキングを行った。次に、ストレプトアビジンアルカリフォスファターゼコンジュゲート溶液（3% BSAを含む緩衝液Aで原液を2000倍希釈したもの）45 mlに浸し、室温で30分間反応させた。次に、スライドガラスを緩衝液A 50 mlに浸し、室温で5分間放置した。これを2回繰り返し、ビオチンと結合しなかったコンジュゲートを除去した。次に、スライドガラスを緩衝液B 30 mlで1回洗浄した。最後に基質溶液（緩衝液B 20 ml + BCIP溶液 18 μl + NBT液 36 μl）に浸し、室温で3時間放置し、発色反応を行った結果、スライドガラス上の配列番号2に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを固定化した位置にのみ色素沈着が得られ、t e tを固定化した位置には色素沈着は検出されなかった。

【0118】

【実施例5】(1) カルボジイミド化スライドガラス上への核酸の固定

大腸菌O-157の染色体DNAを鋳型として、配列番号1及び4に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとするPCR（ポリメラーゼ・チェイン・リアクション）によって、配列番号5に示す塩基配列を有するVT2遺伝子（ペロ毒素遺伝子）断片を増幅した。

【0119】上記増幅産物を0.1 pmol/μlになるように2M NaClに溶解し、DNA溶液とした。SPBIO（日立ソフトウェアエンジニアリング社製、arrayer）を用い、上記製造例1で得られたカルボジイミド化スライドガラスの所定の位置に、前記DNA溶液を直径200 μmで1000箇所スポットした。DNAをスポットしたカルボジイミド化スライドガラスを乾燥機に入れ、37℃で15分間乾燥した。次いで、3% BSAを含む緩衝液Aに浸し、37℃で15分間乾燥した。次にスライドガラスをTE緩衝液で洗浄した後、37℃で15分間乾燥し、核酸（二本鎖DNA）を固定化したカルボジイミド化スライドガラスを得た。

【0120】(2) ハイブリダイゼーション

DNAを固定化したカルボジイミド化スライドガラスを100℃熱水中に10分間浸漬し、氷冷水中に5分間浸漬し、二本鎖DNAを変性させた。このスライドガラスのDNAを固定化した部分に、ハイブリダイゼーション

溶液30 μlを載せ、スライドガラスをパラフィルムで覆って、42℃のウォーターバスで一晩加熱した。ハイブリダイゼーション溶液の組成は以下の通りである。

尚、ビオチン化ブローブは、前記オリゴヌクレオチドプライマーを用いて、VT2遺伝子を増幅することによって作製した。これを熱変性させてブローブとした。

【0121】〔ハイブリダイゼーション溶液の組成〕

5×SSC（SSC：1.5M NaCl、0.15Mクエン酸ナトリウム）

1×デンハーツ溶液（Denhardt's solution）

25mM リン酸ナトリウムバッファー（Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>含有） pH 6.5

45% ホルムアミド

10ng/ml サケ精子DNA

2pmol ビオチン化ブローブ

【0122】(3) ポストハイブリダイゼーション洗浄  
ハイブリダイゼーションの後、スライドガラスからパラフィルムを取り除き、ハイブリダイゼーション溶液を軽く吸い取った後、以下の条件でポストハイブリダイゼーション洗浄を行い、非特異的に吸着したブローブを除去した。

【0123】〔ポストハイブリダイゼーション洗浄液及び条件〕

第1段階：2×SSC、1% SDS；室温、5分間、2回

第2段階：0.2×SSC、1% SDS；40℃、5分間、2回

第3段階：2×SSC；室温、5分間、1回

【0124】(4) ハイブリダイゼーションの検出

3% BSAを含む緩衝液A 50 mlに、上記ポストハイブリダイゼーション洗浄後のスライドガラスを浸漬し、室温で30分間ブロッキングを行なった。次に、これらをストレプトアビジン-アルカリフォスファターゼ・コンジュゲート溶液（Gibco BRL社製、3% BSAを含む緩衝液Aで原液を1000倍希釈したもの）20 mlに浸漬し、室温で30分間反応させた。次いで、スライドガラスを緩衝液A 50 mlに浸漬し、室温で5分間放置した。これを2回繰り返し、ビオチンと結合しなかったコンジュゲートを除去した。

【0125】次に、スライドガラスを緩衝液B 30 mlで1回洗浄した。最後に、スライドガラスを基質溶液（緩衝液Bの30 ml + BCIP溶液 25 μl + NBT液 50 μl）に浸漬し、室温で3時間放置し、発色反応を行った結果、スライドガラス上のDNAを固定した位置に色素沈着が得られた。

【0126】

【実施例6】実施例1の(1)において、カルボジイミド化スライドガラスの代わりに、製造例2で得られたイソシアネート化スライドガラスを用いた以外は、実施例1の(1)と同様にして、核酸を固定化したイソシアネート化スライドガラスを得た。

【0127】

【実施例7】実施例2の(1)において、カルボジイミド化スライドガラスの代わりに、製造例2で得られたイソシアネート化スライドガラスを用いた以外は、実施例2の(1)と同様にして、核酸を固定化したイソシアネート化スライドガラスを得た。

【0128】

【実施例8】実施例3の(1)において、カルボジイミド化スライドガラスの代わりに、製造例2で得られたイソシアネート化スライドガラスを用いた以外は、実施例3の(1)と同様にして、核酸を固定化したイソシアネート化スライドガラスを得た。

【0129】

【実施例9】実施例1の(1)において、DNAをスポットしたカルボジイミド化スライドガラスを乾燥機に入れ、37℃で15分間乾燥する工程の代わりに、カルボジイミド化スライドガラスに紫外線(254nm)を120mJ/cm<sup>2</sup>照射した以外は、実施例1の(1)と同様にして、核酸を固定化したカルボジイミド化スライドガラスを得た。

【0130】

【実施例10】実施例6において、DNAをスポットしたイソシアネート化スライドガラスを乾燥機に入れ、37℃で15分間乾燥する工程の代わりに、イソシアネート化スライドガラスに紫外線(254nm)を120mJ/cm<sup>2</sup>照射した以外は、実施例6と同様にして、核酸を固定化したイソシアネート化スライドガラスを得た。

【0131】

【比較例1】(1)ポリ-L-リジンコートスライドガラス上への核酸固定

配列番号2に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド(21mer)を、100ng/μlになるように0.2×SSCに溶解し、DNA溶液とした。SPBIO(日立ソフトウェアエンジニアリング社製、arrayer)を用い、ポリ-L-リジンコートスライドガラス(シグマ社製)の所定の位置に、前記DNA溶液を直径200μmで500箇所スポットした。対照として、プローブに対して相補性を有しないDNA(tet)を100箇所スポットした。DNAをスポットしたポリ-L-リジンコートスライドガラスをチャンバーに入れ、室温で2時間反応した。次いで、減圧乾燥機で80℃、2時間乾燥させた。スライドガラスを0.1%SDSで洗浄した後、ブロッキング溶液(無水コハク酸;1g、N-メチル-ピロリドン;100ml、0.2Mホウ酸ナトリウム、pH8.0;100ml)に室温で10分間浸した後、蒸留水で4回洗浄し、核酸を固定化したポリ-L-リジンコートスライドガラスを得た。

【0132】(2)ハイブリダイゼーション

DNAを固定化したポリ-L-リジンコートスライドガラスのDNAを固定化した部分に、ハイブリダイゼーシ

ョン溶液50μlを載せ、スライドガラスをパラフィルムで覆って、42℃のウォーターバスで一晩加熱した。ハイブリダイゼーション溶液の組成は以下の通りである。尚、ビオチン化プローブは、実施例1で用いたビオチン化プローブと同じものを使用した。

【0133】【ハイブリダイゼーション溶液の組成】

3×SSC

10%デキストラン

1pmolビオチン化プローブ

【0134】(3)ポストハイブリダイゼーション洗浄  
ハイブリダイゼーションの後、スライドガラスからパラフィルムを取り除き、ハイブリ溶液を軽く吸い取った後、以下の条件でポストハイブリダイゼーション洗浄を行ない非特異的に吸着したプローブを除去した。

【0135】【ポストハイブリダイゼーション洗浄条件】

第1段階:2×SSC、0.1%SDS;室温、5分間、2回

第2段階:0.2×SSC、0.1%SDS;40℃、5分間、2回

第3段階:2×SSC;室温、5分間、1回

【0136】(4)ハイブリダイゼーションの検出

3%BSAを含む緩衝液A50mlに浸し、室温で30分間ブロッキングを行った。次に、ストレプトアビジンアルカリフォスファターゼコンジュゲート溶液(3%BSAを含む緩衝液Aで原液を2000倍希釈したもの)45mlに浸し、室温で30分間反応させた。次に、スライドガラスを緩衝液A50mlに浸し、室温で5分間放置した。これを2回繰り返し、ビオチンと結合しなかったコンジュゲートを除去した。次に、スライドガラスを緩衝液B30mlで1回洗浄した。最後に基質溶液(緩衝液B20ml+BCIP溶液18μl+NBT液36μl)に浸し、室温で3時間放置し、発色反応を行った結果、色素沈着は得られなかった。

【0137】

【比較例2】(1)ポリ-L-リジンコートスライドガラス上への核酸固定

配列番号2に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド(21mer)を、100ng/μlになるように0.2×SSCに溶解し、DNA溶液とした。SPBIO(日立ソフトウェアエンジニアリング社製、arrayer)を用い、ポリ-L-リジンコートスライドガラス(シグマ社製)の所定の位置に、前記DNA溶液を直径200μmで500箇所スポットした。対照として、プローブに対して相補性を有しないDNA(tet)を100spot、スポットした。DNAをスポットしたポリ-L-リジンコートスライドガラスをチャンバーに入れ、室温で2時間反応した。次いで、減圧乾燥機で80℃、2時間乾燥させた。次にスライドガラスを0.1%SDSで洗浄した後、ブロッキング溶液(無水コハク酸;1g、N-メチル-ピロリドン;100ml、0.

2Mホウ酸ナトリウム、pH 8.0; 100ml)に室温で10分間浸した後、蒸留水で4回洗浄し、核酸を固定化したポリーレーリジンコートスライドガラスを得た。

【0138】(2) ハイブリダイゼーション  
DNAを固定化したポリーレーリジンコートスライドガラスのDNAを固定化した部分に、ハイブリダイゼーション溶液50μlを載せ、パラフィルムで覆って、42°Cのウォーターバスで一晩加熱した。ハイブリダイゼーション溶液の組成は以下の通りである。尚、ビオチン化プローブは、実施例1で用いたビオチン化プローブと同じものを使用した。

【0139】【ハイブリダイゼーション溶液の組成】

3×SSC

10% デキストラン

1pmol ビオチン化プライマー

【0140】(3) ポストハイブリダイゼーション洗浄  
ハイブリダイゼーションの後、スライドガラスからパラフィルムを取り除きハイブリダイゼーション溶液を軽く吸い取った後、以下の条件でポストハイブリダイゼーション洗浄を行ない非特異的に吸着したプローブを除去した。

【0141】【ポストハイブリダイゼーション洗浄条件】

第1段階: 2×SSC, 0.1% SDS; 室温、5分間、2回

第2段階: 0.2×SSC, 0.1% SDS; 40°C、5分間、2 \*

\* 回

第3段階: 2×SSC; 室温、5分間、1回

【0142】(4) 検出

3%BSAを含む緩衝液A50mlに浸し、室温で30分間ブロッキングを行った。次に、ストレプトアビジンアルカリフォスファターゼコンジュゲート溶液(3%BSAを含む緩衝液Aで原液を2000倍希釈したもの)45mlに浸し、室温で30分間反応させた。次に、スライドガラスを緩衝液A50mlに浸し、室温で5分間放置した。これを2回繰り返す、ビオチンと結合しなかったコンジュゲートを除去した。次にスライドガラスを緩衝液B30mlで1回洗浄した。最後に基質溶液(緩衝液B20ml+BCIP溶液18μl+NBT液36μl)に浸し、室温で3時間放置し、発色反応を行った結果、色素沈着は得られなかった。

【0143】

【発明の効果】本発明により、DNAが安定に固定化された核酸固定化基板が提供される。本発明の基板には、核酸が、鎖の数や長さに制限されずに固定され得るので、同一基材上で種々の核酸を同時に扱うことができる。

【0144】また、核酸を共有結合により強固に担体に結合させているため、再現性、定量性に優れたDNAチップとしての用途に有効な核酸固定化基板となり得る。

【0145】

【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

<10> 日清紡績株式会社(Nisshinbo Industries, Inc.)

<20> 核酸固定化基板

<30> P-7605

<50> JP 11-173966

<51> 1999-06-21

<60> 5

<70> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 1

aaatgggtac tgtgcctgtt a

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 2

27

gttaccacaca taccacqaat c

28

21

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1254

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Escherichia coli

&lt;400&gt; 3

aaatgqgtac tgtgcctggt actgqgtttt ccttcggtat cctattcccq ggaqgtttatg 60  
 atagactttt cgacccaaca aagttatgtc tcttcgttaa atagtatacg gacagagata 120  
 tcgacccctc ttgaacatat atctcagggg accacatcgg tgtctgttat taaccacacc 180  
 ccaccgggca gttattttgc tgtgatatata cgaggcgctt atgtctatca ggcgcgtttt 240  
 gaccatcttc gtctgattat tgaqcaaat aatttatatg tggctgggtt cgttaatacg 300  
 qcaacaata ctttctaccg tttttcagat ttacacata tatcagtgc cgttgtgaca 360  
 acggtttcca tgacaacgga cagcagttat accactctgc aacgtgtcgc agcgcgtgaa 420  
 cgttcgqaa tgacaatcag tcgtcactca ctggtttcat catatctgac gttaatggaq 480  
 ttcagtggta atacaatgac cagagatgca tccagagcag ttctgcgttt tgcactgtc 540  
 acagcagaag ctttacgctt cagcagata cagagagaat ttcgtcaggc actgtctgaa 600  
 actgtctctg tgtatacgat gacgccggga gacgtggacc tcactctgaa ctggggcgca 660  
 atcagcaatg tgcttcgqga gtatcgggga gaggatggtg tcagagtgga gagaatatcc 720  
 tttataata tatcgcgat actgggcact gtggccgtta tactgaattg tcacatcag 780  
 ggggcgcgtt ctgttcgcgc cgtgaatgaa gaggatcaac cagaatgtca gataactggc 840  
 gacagggccg ttataaaaat aaacaataca ttatgggaaa gtaatacagc tgcagcgttt 900  
 ctgaacagaa agtcacagtt tttatataca acgggtaaat aaaggagtt aqtatgaaga 960  
 agatgtttat ggcgggttta ttgcattag tttctgttaa tgcattggc gcggattgca 1020  
 ctaaaagtaa aattgaqgtt tccaagtata atgagaatga tacattcaca gtaaaagtgg 1080  
 ccgaaaaga gtactggacc agtcgtgga atctgcaacc gttactgcaa agtctcagt 1140  
 tgacaggaat gactgtcaca attaaatcca gtacctgtga atcaggctcc ggaattgctg 1200  
 aagtgcagtt taataatgac tgaqcataa cctgattcgt ggtatgtggg taac 1254

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: primer for PCR

&lt;400&gt; 4

agccacatat aaattatttt g

21

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 285

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Escherichia coli

&lt;400&gt; 5

aaatgqgtac tgtgcctggt actgqgtttt ccttcggtat cctattcccq ggaqgtttatg 60  
 atagactttt cgacccaaca aagttatgtc tcttcgttaa atagtatacg gacagagata 120  
 tcgacccctc ttgaacatat atctcagggg accacatcgg tgtctgttat taaccacacc 180  
 ccaccgggca gttattttgc tgtgatatata cgaggcgctt atgtctatca ggcgcgtttt 240  
 gaccatcttc gtctgattat tgaqcaaat aatttatatg tggct 285



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

テマコード (参考)

G 0 1 N 33/566

C 1 2 Q 1/68

A

// C 1 2 Q 1/68

C 1 2 N 15/00

Z N A A

(72)発明者 塩畑 奈美子

千葉県千葉市緑区大野台1-2-3 日清  
紡績株式会社研究開発センター内

(72)発明者 松村 嘉之

千葉県千葉市緑区大野台1-2-3 日清  
紡績株式会社研究開発センター内